

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平2-114

⑮ Int. Cl.<sup>5</sup>

A 61 K 37/465  
C 07 K 15/06

識別記号

ACC

序内整理番号

8615-4C  
8318-4H

⑬ 公開 平成2年(1990)1月5日

審査請求 未請求 請求項の数 22 (全7頁)

⑭ 発明の名称 トロビン凝固性蛋白質の濃縮物、その製造方法及びその治療的用途

⑯ 特 願 昭63-191977

⑰ 出 願 昭63(1988)7月29日

優先権主張 ⑱ 1987年7月30日 ⑲ フランス(FR) ⑳ 8710798

⑳ 発 明 者 ミリアナ ビュルヌフ フランス国 F-59136 ワブラン リュ デュ ドクト  
ウール シヤフネ 5

㉑ 発 明 者 テーリーイ ビュルヌフ フランス国 F-59136 ワブラン リュ デュ ドクト  
ウール シヤフネ 5

㉒ 出 願 人 サントル レジヨナル フランス国 F-59102 リル リュ カミュー ゲラン  
ド トランスヒュジ  
オン サンギーヌ ド  
リル

㉓ 代 理 人 弁理士 三枝 英二 外2名

明 細 書

発明の名称

トロビン凝固性蛋白質の濃縮物、その製造  
方法及びその治療的用途

特許請求の範囲

① 70%以上の凝固性フィブリノゲンを含有し、

内在性ファクターXⅢを含有し、大気温度にて  
約150g/l蛋白質濃度まで水性溶液に急速  
に溶解することを特徴とするトロビン凝固性  
蛋白質濃縮物。

② 蛋白質1g当たり、少くとも0.10IUの内  
ターXⅢ及び0.35mg以下のアルブミンを  
含有する請求項1に記載の濃縮物。

③ 蛋白質1g当たり0.03-0.10gのフィ  
ブロンクテンを含有する請求項1又は2に記載  
の濃縮物。

④ 請求項1乃至3のいずれかに記載の濃縮物か  
ら得られる注射用フィブリノゲン。

⑤ 蛋白質含有量が17-20g/lである請求  
項4に記載の注射用フィブリノゲン。

⑥ 請求項1乃至3のいずれかに記載の濃縮物か  
ら得られる生物学的膠質。

⑦ 蛋白質含有量が100-120g/lである  
請求項6に記載の生物学的膠質。

⑧ 希エタノールを用いて全血漿を低温沈澱させ  
る工程を含む請求項1乃至3のいずれかに記載  
の濃縮物の製造方法。

⑨ 10%エタノールを用い、pH7.2、4℃  
にて、少くとも24時間、全血漿を沈澱させる  
請求項8に記載の製造方法。

⑩ 沈澱物をリジンの存在下に再溶解する請求項  
8又は9に記載の製造方法。

⑪ 最終生成物中のリジン含量が蛋白質1g当  
り0.1-0.2gに相当する量となるリジン  
を添加する請求項10に記載の製造方法。

⑫ 再溶解した沈澱物を30-40℃で希エタノ

ールで処理する請求項8乃至11のいずれかに記載の製造方法。

- ⑬ 70-75%のフィブリノゲン、及び蛋白質1g当り0.10-0.25IUの内在性ファクターXⅢ及び0.05-0.10gのフィブロネクチンを含有する、請求項12に記載の方法により得られるトロンビン凝固性蛋白質濃縮物。
- ⑭ 請求項13に記載の濃縮物から得られる注射用フィブリノゲン。
- ⑮ 請求項13に記載の濃縮物から得られる生物学的膠質。
- ⑯ 再溶解した沈澱物をウイルス不活性化処理に供する請求項8乃至11のいずれかに記載の製造方法。
- ⑰ ウイルス不活性化処理が溶媒及び洗浄剤を用いる処理である請求項16に記載の製造方法。
- ⑱ ウイルス不活性化処理の後に希エタノールを

用いる低温沈澱処理を行う請求項16又は17に記載の製造方法。

- ⑲ 10%エタノールを用い、4℃にて約12時間沈澱させる請求項18に記載の製造方法。
- ⑳ 90-95%のフィブリノゲン、及び蛋白質1g当り0.15-0.30IUの内在性ファクターXⅢ及び0.03-0.06gの内因性フィブロネクチンを含有する請求項18又は19に記載の製造方法により得られるトロンビン凝固性蛋白質濃縮物。
- ㉑ 請求項20に記載の濃縮物から得られる注射用フィブリノゲン。
- ㉒ 請求項20に記載の濃縮物から得られる膠質。

#### 発明の詳細な説明

本発明は、トロンビン凝固性蛋白質の濃縮物、全血漿からこれを得る方法及び治療を目的としたその用途に関する。

この種の濃縮物は、再溶解することにより注射可能なフィブリノゲン又は生物学的膠質(biological glues)を製造するのに用いられ得る。

周知の如く、フィブリノゲンの注射は、出血を伴うか伴わない低フィブリノゲン血症又は全身性無フィブリノゲン血症状態の治療を可能とし、さらに重篤な出血を伴う急性脱線維素症候群の治療をも、病因的治療、ヘパリン治療又は抗フィブリノ溶解治療と併合させて、可能とする。

一方、生物学的膠質は、皮膚移植、神経又は動脈縫合、早期瘻痕形成又は止血性及び／又は静菌性及び／又は麻酔効果が求められるあらゆる用途等のある種の臨床的エピソードにおいて十分に役立つことができる。事実、その様な主要濃縮物の主要成分であるフィブリノゲンは、カルシウムイオンにより活性化されたトロンビンと接触する場合、酵素的に分解される。フィブリノペプチドA及びBを排出した後、フィブリンモノマーが重合

し、自然に可溶性フィブリンを生成する。この種の生成物におけるファクターXⅢの存在は、フィブリンを不溶性にすることにより、即ち、尿素等の溶媒に対し抵抗性とするることにより、共有結合によるフィブリンの安定化に寄与する。かくして安定化されたフィブリンは、その凝固能に加えて、線維素溶解及び機械的トラクティヤ(tractia)に対してさらに抵抗性となる。

これらの異なる治療的使用のためには、使用条件下に溶解性がよく且つ安定性である血症由来の生成物を入手可能とすることが必要である。生物学的膠質に関する限りでは、石灰性トロンビンと接触して置かれた後、該膠質が高度な接着性及び高度な弾性を有することが更に必要である。

この様な特性を得るという事実は、生成物の性質、及び血漿からのその精製方法に直接的に関連する。従って、産業的スケールで容易に利用でき、且つ、臨床家による所望の用途のための生成物の

生物化学的特性を損なわないように十分に穏やかな方法を得ることが有用である。

フィブリノゲン及びファクターXⅢを含む膠質は、特にフランス特許第2448900号及び第2448901号において既に公知である。該膠質は、プラスミノゲン阻害物-活性物又はプラスミン阻害物(これらの物質は、凍結乾燥状態の膠質に存在する)を含有する緩衝液で処理することにより、血漿寒冷沈降物から得られる。

上記生成物は、興味深い特性を有する。しかしながら、これらの生成物は、最終的に良好な混合物を得ることができるように、ファクターXⅢ等の他の血漿蛋白質の外的添加を必要とする相当複雑なフィブリノゲン製造法によって得られている。更に、製造の際、ウシアプロチニンのような動物由来のプロテアーゼ阻害物質等の阻害物質を添加せねばならない。

その上、公知の蛋白質濃縮物は、特に膠質とし

て用いられるものは、大気温度では水性溶媒に溶解せず、37℃においてさえ溶解しにくいかもしれない、生成物の凍結乾燥バイアル中に磁石棒を加え、溶解性を促進させるために用いられる磁気攪拌機を使用する必要がある。

従って、蛋白質の外的添加を行うことなく、上記の様な生成物として所望の性質に相当する蛋白質混合物を得ることができるように、生物学的膠質を製造できる単純な方法を得ることが極めて有利である。特に、膠質としての使用のために、得られた濃縮物は、満足すべきフィブリノゲン、ファクターXⅢ、フィブロネクチン濃度を持つべきである。

また、その様な方法は、ウイルス不活性化ステップを導入するための修飾にも容易に適用できるものでなければならない。得られる生成物は、特別の器具を必要とせず、使用温度(一般に18-20℃)で10分以内に溶解しなければならない。

また、該生成物は、使用を容易にし、その臨床的効率を促進し、保証すべく、数時間は安定であらねばならない。

従って、本発明者は、全ての血液分画センターで入手できる血漿分画を用いる方法によって、用いられる簡単な分画法を通じ、存在する全蛋白質に対して70%以上の凝固性フィブリノゲン及び十分量の内在性ファクターXⅢを含有するトロンビン凝固性蛋白質濃縮物の簡単な製造方法を完成した。

従って、本発明は、エタノールを用いるヒト又は動物の血漿の沈澱及び処理によって得られ、全蛋白質に対して70重量%以上の凝固性フィブリノゲン及び内在性ファクターXⅢを含有するトロンビン凝固性蛋白質濃縮物にも関する。

本発明の濃縮物は、公知の物質とは反対に、大気温度において急速に、即ち、水性媒体中150g/lにも達する蛋白質濃度で10分以内に溶解

する。更に、これを例えば4-37℃で保つ場合、再構成の後、少なくとも24時間は安定である。

本濃縮物は、蛋白質1g当たり内在性ファクターXⅢを少くとも0.10IU含有するのが有利である。

更に、該濃縮物は、特に0.03-0.10g/1g蛋白質の均等量のフィブロネクチンを含有する。

注射用フィブリノゲンとするために、再溶解による再構成後の全蛋白質含量が17-29g/l程度となるように、濃縮物を製剤化し、調整する。生物学的膠質としての用途のためには、該全蛋白質含量を約100-120g/lとする。

本発明の濃縮物は、中性に近いpH及び低温度にて希エタノールを用い、寒冷沈降されていない全血漿を沈澱させることにより、得られる。

方法の操作条件は、殆ど変性しない沈澱物が得られる様に調整され、従って、従来の工業的血漿

処理条件下に沈澱ステップを実施する場合、蛋白質が供される分解を回避する。従って、払われる注意とは別に、特にエタノール濃度と温度に関する限り、磁石棒を備えた小さい容器（例えば10ℓ）中で血漿を処理することが望ましい。次いで、血漿を、24時間以上数日間までの一定期間、例えば8-12%の低濃度エタノールと接触させておく。上清みをデカントし、これを他の派生物の調製に利用できる。

遠心分離後、得られた沈澱物を、例えば0-6℃の低温度にて、6-12%、好ましくは10%のアルコールで洗浄し、全体を遠心分離にかける。

次いで、トリス／クエン酸緩衝液に沈澱物を再溶解し、出来れば濃縮し、濾過し、好ましくは、次の処理に供する前に、凍結乾燥する。所望であれば、そのまま、即ち、非凍結乾燥状態で処理してもよい。

本発明の蛋白質濃縮物を得るための次の処理は、

エタノールを除去する。該緩衝液は、好ましくは利用可能な製品中の所望量に相当する量のリジンを含むが、凝固現象におけるクエン酸の明らかに有害な作用を考慮すると、最終生成物におけるクエン酸の濃度が出来るだけ小さくなるように、クエン酸を含むしないほうが有利である。

得られた生成物を無菌濾過し、使用バイアルに充填し、凍結乾燥する。

第2の方法によれば、凍結乾燥物又はそれに相当する新鮮なペーストを、再溶解後、ウイルス不活性化ステップ、例えば、溶媒及び洗浄剤による処理に供する。次に、この処理による残渣を好ましくは希エタノールを用いた寒冷沈降によって除去する。

この方法において、フィブリノゲン凍結乾燥物又はそれに相当する新鮮なペーストを約20g/lの蛋白質濃度で再溶解する。次いで、本発明に従って、ウイルス不活性化処理、例えば、溶

媒及び洗浄剤による処理に供する。

第1の方法において、凍結乾燥物又はそれに相当する新鮮なペーストを、好ましくはリジンを含有する水又はトリス／クエン酸緩衝液に再溶解し、得られた溶液を温希エタノールで処理する。

この方法に従って、フィブリノゲン凍結乾燥物又はそれに相当する新鮮なペーストを50g/l程度の蛋白質含量で再溶解し、30-40℃、好ましくは35℃にて、約1.5時間、8-12%エタノールで処理する。好ましくはリジンの存在下に実施されるこのステップは、凍結乾燥された生物学的膠質の良好な溶解に寄与し、一方、AIDSウイルス等の存在しうる病原菌の不活性化について安全性を増大させる。

用いられるリジンの量により、利用可能な製品中のリジン濃度を0.1-0.2g/l蛋白質とすることができる。

緩衝液を使用する限外濾過又は透析濾過により

媒及び洗浄剤による処理に供する。

このステップは、好ましくは、24℃以上で6時間以上実施され、AIDSウイルス、肝炎ウイルス等の存在しうる病原ウイルスの不活性化について安全性を増加させる。これは、利用可能な製品中のリジン濃度0.1-0.2g/l蛋白質に相当する濃度のリジンの存在下に実施されることが好ましい。

蛋白質濃縮物の純度の増加を伴うウイルス不活性化剤の除去は、8-12%エタノールを用いる低温度での蛋白質の再沈澱により、実施される。遠心分離の後、ウイルス不活性化剤及びアルブミン等の混在蛋白質を上清みに除去する。所望であれば、沈澱物をエタノール溶液で再沈澱させることにより、ウイルス不活性化剤をより良好に除去できる。

滅菌、濾過及び分散(distribution)の前に、沈澱物をトリス／クエン酸／リジン緩衝液に再び

溶解し、限外濾過し、透析濾過する。限外濾過の目的は、クエン酸及びエタノールの除去並びに蛋白質1g当り0.1-0.2gの一定量のリジン含量を維持することにある。

本発明の濃縮物を生物学的膠質として用いる場合、製品の使用前の膠質の再構成は、10000IU/mlのアプロチニン水溶液によって実施され、得られた溶液を500IU/mlの石灰性トロンビンと混合する。

製品は、ダブルニードルシステム(double needle system)により調製された液体の形状(一方では再構成された生物学的膠質、他方では石灰性トロンビン)又は乾いた形状(粉末)又はスプレーの形で用いる。

下記に実施例を挙げ、本発明を説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

#### 実施例 1

##### A. 蛋白質濃縮物の生成

濃度で懸濁状態に戻す。次いで、35℃にて1.5時間10%エタノールによる第二次処理にかけらる。

クエン酸及びエタノールを除去し、蛋白質含量を例えば35g/lの適当な値にするために透析濾過した後、濃縮物を濾過し、無菌下に調整し、例えば、0.5、1、2、又は5ml溶液としての以後の使用のための最終バイアル中で凍結乾燥させる。

##### B. 蛋白質濃縮物の生化学的分析

生成物の蛋白質組成は、下記のとおりである(蛋白質1g当りで表す)：

フィブリノゲン	0.70-0.75 g
内在性ファクターXIII	0.10-0.25 IU
フィブロンectin	0.05-0.10 g

#### 実施例 2

##### A. 蛋白質濃縮物の生成

用いられる血漿は、採血の6時間以内に、血液

を遠心分離して得られ、-35℃で凍結させる。濃縮物を製造するために、37℃で解凍する。次いで、pH7.2、蛋白質含量52g/l、4℃の10%エタノールを用いて、沈殿させる。混合物を30分間攪拌し、次いで、4℃で最小限24時間放置して、沈降させる。

エタノール上清液を遠心分離により除去し、特にフィブリノゲン及びファクターXIIIに富んだ沈殿物を回収する。予め4℃に冷却した10%エタノール溶液を用いて、該沈殿物を完全に洗浄し、再度遠心分離にかける。

次いで、沈殿物をトリス/クエン酸緩衝液に再溶解し、蛋白質濃度15-20g/lに濃縮し、濾過し、所望であれば、凍結乾燥する。

3g/lのリジン溶液(最終製品中の蛋白質1g当りのリジン濃度0.1-0.2gに相当する)を用いて、得られた生成物を50g/lの蛋白質

を遠心分離して得られ、-35℃で凍結させる。濃縮物を製造するために、37℃で解凍する。次いで、pH7.2、蛋白質含量52g/l、4℃の10%エタノールを用いて、沈殿させる。混合物を30分間攪拌し、次いで、4℃で最小限24時間放置して、沈降させる。

エタノール上清液を遠心分離により除去し、特にフィブリノゲン及びファクターXIIIに富んだ沈殿物を回収する。予め4℃に冷却した10%エタノール溶液を用いて、該沈殿物を完全に洗浄し、再度遠心分離にかける。

次いで、沈殿物をトリス/クエン酸緩衝液に再溶解し、蛋白質濃度15-20g/lに濃縮し、濾過し、所望であれば、凍結乾燥する。

リジン溶液(最終生成物中の蛋白質1g当りのリジン濃度0.1-0.2gに相当する)を用いて、得られた生成物を約20g/lの蛋白質濃度の懸濁状態に戻す。次いで、24℃以上で6時間

以上、0.3%TNBP及び1%Tween 80を用いる溶媒及び洗浄剤による処理に供する。

次いで、得られる溶液を4℃で10%エタノールによるアルコール沈澱に供し、約10時間デカントさせる。

遠心分離し、上清（ウイルス不活性化剤を含有することもある）を除去した後、沈澱物を回収し、蛋白質1g当りのリジン0.1-0.2gに相当するリジンを含有するトリス/クエン酸緩衝液に溶解する。

イオン強度を調節し、クエン酸及びエタノールを除去し（しかし、リジンは保持する）、蛋白質含量を例えば35g/lの適当な値にするための透析濾過した後、濃縮物を濾過し、無菌下に調整し、0.5、1、2、又は5ml溶液としての以後の使用のための最終バイアル中で凍結乾燥させる。

#### B. 蛋白質濃縮物の生化学的分析

更に、4℃、20℃又は37℃に24時間保たれた再構成生成物においても、脱安定化（destabilization）はみられない。

本発明の生物学的膠質に関する限り、そのまま使用しても、優れた特性を有するものと考えることができる。事実、その接着能力は、動物に皮膚切片を接着させる試験において、100g/cm<sup>2</sup>以上であり、その値は寒冷沈降法により製造された他の膠質で得られたものよりも大きい。この接着能力は、生物学的膠質を再構成し、4℃又は20℃で24時間保存した後、該値の90%で維持される。その上、蛋白質濃縮物と石灰性トロンビンとを混合する間、滲出をみない。実施された臨床試験は、この生物学的膠質の使用上の制約、即ち、迅速な溶解の必要性、手術室温度での安定性、使用の遅延可能性に対する大きな適応性を明らかにした。

本発明の膠質の用途は、その特性から以下のと

生成物の蛋白質組成は、下記のとおりである（蛋白質1g当りで表す）：

フィブリノゲン	0.90-0.95 g
内在性ファクターXIII	0.15-0.30 IU
フィブロンectin	0.03-0.06 g

添付の図面は、本発明の上記の濃縮物（カーブ1a）及び生物学的膠質として利用されている市販濃縮物（カーブ1b-1d）から各々得られた電気泳動法による分析結果を示す。

本発明の生成物のゾーンγ（フィブリノゲン）の成分の著しく高い純度が、これらのカーブから明らかである。

上記のごとく、本発明の濃縮物は、優れた溶解性及び安定性を持つ。

事実、その溶解時間は、特別な機器を必要とせず、単純な手動の回転運動により、37℃ばかりか20℃においても、10分以下、5分でさえある。

おりである：その接着及び止血能力により、外科的手術において、その手術時間の延長を可能とする貴重なアジュヴァントとして用いられる。更に、その静菌能力は、傷又は縫合部の瘢痕形成を増強し、促進する。

従って、その用途は、種々の外科領域に応用される：

- 形成外科術及び顕微外科術：火傷の皮膚移植、切片の膠着、しわ延ばし術、眼瞼形成術。
- 神経外科術：形成外科術、硬膜縫合、腫瘍切除止血（lumbar exeresis hemostasis）、静脈洞止血。
- 心臓血管外科術：人工血管の縫合の封鎖、大動脈切開、動脈瘤。
- 一般及び腹腔外科術：内臓裂の膠着（脾臓、腎臓、肝臓等）又は肝臓バイオペシー、消化器の吻合、フィステル、手術腔の止血。
- 骨格外科術：皮質接着、腱の縫合、骨髄炎シー

ト (seat) の接着。

—口腔外科術：出血危険性の高い（血友病）患者における抜歯シートの止血。

—耳鼻咽喉外科術：鼓膜の傷の修復、扁桃摘出。

本発明の膠質は、ヒト又は動物の血漿から製造することができ、ヒト又は動物の治療に有利に用いることができる。

本発明の注射用フィブリノゲンに関する限り、優れた使用特性を有し、そのバランスされた組成は、低フィブリノゲン血症又は無フィブリノゲン血症状態の治療及び急性脱線維素症候群の治療に有用な貴重な治療剤となる。

全身的欠乏症について、通常の投与量は、フィブリノゲンの半減期が3-4日であり、十分な止血に要求される血漿中濃度が約1g/lであることを考慮する場合、患者の体重に応じて1-4gである。

急性脱線維素症状において、状況に応じて、投

与量は2-10gの範囲で変化する。

本発明の治療用生成物は、ヒトまたは動物の血漿から生成され、従って、ヒト用ばかりか動物用医薬品への適応についても利益がある。

図面の簡単な説明

第1図は、本発明の濃縮物（カーブ1a）及び生物学的膠質として利用されている市販濃縮物（カーブ1b-1d）から各々得られた電気泳動法による分析結果を示す。

（以上）

代理人 弁理士 三 枝 英 二

第 1 図

